

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

KEEMIA INSTITUUT
BIOORGAANILISE KEEMIA ÕPPETOOL

Maris-Johanna Tahk
MELANOKORTIIN-4 RETSEPTORI AKTIVATSIOONI UURIMINE
Bakalaureusetöö keemia eriala 12 EAP

Juhendaja: teadur Olga Mazina, PhD

TARTU 2016

SISUKORD

Kasutatud lühendid	3
Sissejuhatus	5
Kirjanduse ülevaade	6
G-valguga seotud retseptorid	6
cAMP signaalirada	6
MC4 retseptor	8
Ligandid	9
Epac valgul põhinevad FRET biosensorid	10
BacMam tehnoloogia	13
Ekspérimentaalne osa	15
Materjalid ja töövahendid	15
Biosensori kloonimine	16
Transforeerimine DH5 α rakkudesse	16
Restrikteerimine	17
pFastBac TM 1 ja H188 biosensori ligeerimine	18
Rekombinatse BacMam bakmiidi tegemine	18
BacMam viiruse tootmine	21
Viiruste tiitrimine ICSE meetodil	21
CHO-K1-MC4R rakkude nakatamine ja katse käik	22
Andmeanalüüs	22
Tulemused ja arutelu	23
Viiruse tiitri määramine	23
Nakatamisprotsessi optimeerimine	24
MC4 Retseptori aktivatsiooni uurimine	26
EDTA mõju MC4 retseptori aktivatsioonile	29
Kokkuvõte	32
Summary	33
Kasutatud kirjanduse loetelu	34
Infoleht	38

KASUTATUD LÜHENDID

ATP – adenosintrifosfaat

cAMP – 3',5'-tsükliline adenosinmonofosfaat

CFP – sinine (*cyan*) fluorestsentsvalk

CHO – Hiina hamstri munasarja rakud (*Chinese hamster ovary cells*)

DMEM – Dulbecco modifitseeritud Eagle sööde (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DNA – desoksüribonukleiinhape

DPBS – Dulbecco fosfaatpuhverdatud soola lahus (*Dulbecco's phosphate-buffered saline*)

E. coli – *Escherichia coli* (soolekepike)

EDTA – etüleendiamiintetraetaanhape

Epac – cAMP efektorvalk (*Exchange proteins directly activated by cAMP*)

FastAP – temperatuuritundlik aluseline fosfataas (*thermosensitive alkaline phosphatase*)

FBS – veiseloote seerum (*Fetal bovine serum*)

FRET – Försteri resonantsenergia ülekanne (*Förster resonance energy transfer*)

G418 – genetitsiin

GDP – guanosiindifosfaat

GTP – guanosintrifosfaat

ICSE – pildianalüüsil põhinev raku suuruse hindamine (*image-based cell size estimation*)

LB – Luria-Bertani sööde

MC4 – Melanokortiin 4

MOI – nakatuskordus ehk viiruseosakeste osakaal rakkude suhtes (*Multiplicity of infection*)

MPAK – mitogeen-aktiveeritava proteiinkinaasid (*mitogen-activated protein kinases*)

MSH – melanotsüüte stimuleeriv hormoon

MT II – melanotaan II

NaBu – naatriumbutanaat

pcDNA – plasmiid ehk tsirkulaarne DNA molekul

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon (*Polymerase chain reaction*)

rpm – pööret minutis (*rotation per minute*)

Sf9 – *Spodoptera frugiperda* rakuliin

SOC – bakterisööde (*Super Optimal Culture media*)

TAE – tris-atsetaat-EDTA

YFP – kollane fluorestsentsvalk

SISSEJUHATUS

G-valguga seotud retseptorid (GPCR) reguleerivad mitmeid olulisi protsesse inimkehas ning nende talitlusega on seotud mitmed haigused. Seega on GPCRid ravimitööstuse jaoks väga olulised ravimimärklauad. Ligikaudu 40% turul olevatest ravimitest on seotud GPCRide signaali radadega (Garland 2013, Heng *et al.* 2013). GPCRide jaoks üks tavaline signaali edasikandmise võimalus on tsükliline adenosiinmonofosfaadi (cAMP) signaalirada, kus G-valk aktiveerib ensüümi mis katalüüsib cAMPi tootmisreaktsiooni. cAMP on meie kehas oluline sekundaarne virgatsaine, mis omakorda aktiveerib erinevaid signaaliradasid.

Melanokortiinse retseptori 4 alatüüp, mis üks väiksemaid GPCRe, on inimkehas laialdaselt levinud ja vahendab mitmeid olulisi füsioloogilisi funktsioone. Selle retseptori peamiseks funktsioonideks peetakse toitumise ja energiahomöostaasi regulatsiooni ning on leitud, et retseptori mutatsioonid põhjustavad ülekaalulisust. Lisaks nähakse melanokortiinse retseptori 4 alatüüpi ligande potentsiaalsete ravimitena nii seksuaalhäirete, sõltuvuse, meeleoluhäirete kui neuropaatilise valu jaoks. (Tao *et al.* 2010)

Viimase 15 aasta jooksul on välja töötatud palju erinevaid biosensoreid, mille abil saab iseloomustada potentsiaalseid ravimikandidaatide. Üheks selliseks biosensoriks on geneetiliselt kodeeritavad Försteri resonantsenergia ülekande (FRET) biosensorid, mille abil saab jälgida cAMPi teket retseptori aktivatsioonil. Uued biosensorid võimaldavad jälgida tekkinud bioloogilist vastust elus rakkudes ja reaalajas. Nii saab potentsiaalse ravimikandidaati kohta koguda palju informatsiooni.

Antud töö eesmärgiks oli iseloomustada ligandide mõju MC4 retseptori aktivatsioonil tekkiva bioloogilise vastuse kaudu, milleks oli vaja kasutusele võtta ja arendada uue põlvkonna cAMP biosensoril põhinevat katsesüsteemi. Ühtlasi uurida kahevalentsete ionide mõju antud retseptor-süsteemile.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

G-valguga seotud retseptorid

G-valguga seotud retseptorid (GPCR) on kõige suurem membraanvalkude perekond (Rosenbaum *et al.* 2009). Inimese genoomis on leitud üle 800 erineva GPCRi kodeeriva geeni, mis jaotatakse järjestuse ja struktuuriliste sarnasuste alusel viide perekonda: rodopsiinilaadsed sekretiinilaadsed, glutamaadilaadsed, adhesiooni ja *Frizzled/Taste2* (Rosenbaum *et al.* 2009) (Fredriksson *et al.* 2003). GPCRide struktuurile on omane seitse rakumembraani läbivat α -heeliksit, mida ühendavad rakusisesed ja -välised aasad, seetõttu nimetatakse neid ka tihti seitsme transmembraanseteks retseptoriteks. Aktiivse retseptoriga on seotud heterotrimeerne G-valk, mis koosneb α -, β - ja γ -alaühikust (Nelson ja Cox 2004). Tavalisemad GPCRi aktiveerivad ligandid on ioonid, peptiidid ja lipiidid, ebatavalisematest võib välja tuua nukleotiidid, orgaanilised lõhnaained ja footonid. (Fredriksson *et al.* 2003)

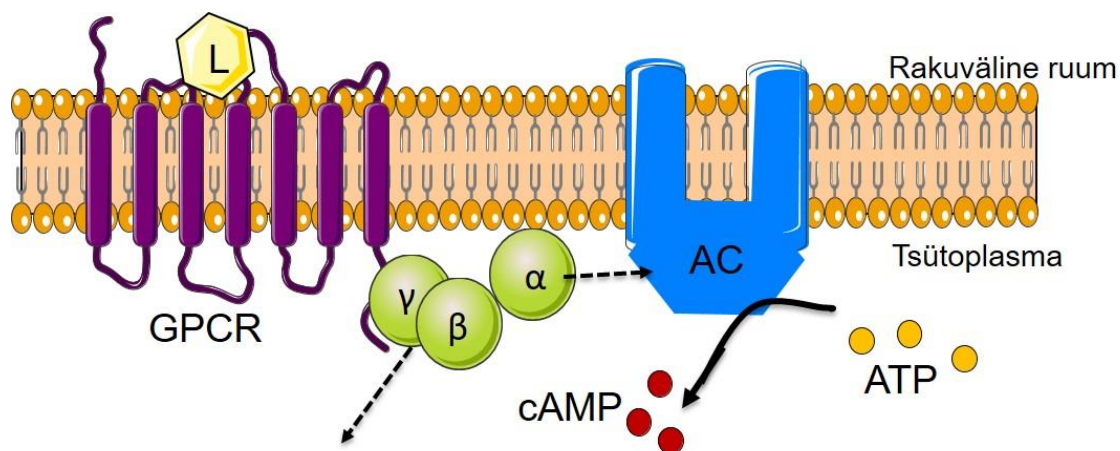
Kuna erinevaid GPCRi on palju ja need vahendavad mitmesuguseid signaale inimkehas, siis on GPCRid üheks oluliseks ravimisihtmärkiks. GPCRide talituslikud häired võivad põhjustada ainevahetuslikke, immunoloogilisi ja neurodegeneratiivseid haigusi, vähki ja nakkushaigusi. (Heng *et al.* 2013). Ligi 40% turul olevatest ravimitest reguleerivad GPCRi signaaliradasid (Garland 2013, Heng *et al.* 2013). GPCRde olulisust kinnitab see, et 2012. aastal pälvisid Nobeli keemia preemia GPCR struktuuri, aktivatsioonimehhanismide ja nende vahendatud signaaliradade uurimise eest Brian Kobilka ja Robert Lefkowitzi.

cAMP signaalirada

G-valke liigitatakse mitmesse eri klassi: G_{as} , $G_{ai/o}$, $G_{aq/11}$ ja $G_{a12/13}$ ning olenevalt konkreetsest klassist võib aktiveeritud α -alaühik omakorda aktiveerida erinevaid signaaliradasid. G_{as} on G-valgu alaühik, mis aktiveerib ensüümi adenülaadi tsüklaas (AC). AC on katalüüsib reaktsiooni, mille käigus adenosinotriifosfaatist (ATP) tootetakse 3',5'-tsüklilist adenosinmonofosfaati (cAMP). $G_{ai/o}$ aga inhibeerib ensüümi AC ja selle käigus vähenab cAMPi kontsentratsiooni raku sees. $G_{a12/13}$ aga tõstab cAMPi sünteesiks vajaliku ATP kontsentratsiooni raku sees. $G_{aq/11}$ on

mitmeid funktsioone: see moduleerib nii diatsüülgütserooli (DAG), inositol-1,4,5-trifosfaat (IP3) kui ka Ca^{2+} ionide taset rakus. (Heng *et al.* 2013)

Joonis 1 illustreerib cAMPi signaaliraja mehhanismi. GPCRile seostub aktiveeriv ligand (agonist), mille tagajärjel toimub retseptori konformatsiooni muutus. Seetõttu on retseptor võimeline katalüüsima guanosiindifosfaadi (GDP)-guanosiintrifosfaadi (GTP) vahetust G-valgus. Kui α -alaühik on GTP poolt aktiveeritud, siis see dissotseerub β - ja γ -alaühikutelt ning liigub mööda membraani edasi kuni seostub AC-le ja aktiveerib selle. β - ja γ -alaühikutest koosnev püsiv dimeer võib aktiveerida teisi signaaliradu, näiteks mitmeid ionkanaleid (Heng *et al.* 2013). AC katalüüsib muudetakse ATP cAMPiks. Kuna α -alaühik on GTP-s, siis see katalüüsib GTP hüdrolyüsi GDP-ks ning kui GTP pole enam seotud α -alaühikuga, siis see dissotseerub AC küljest ning cAMPi tootmine lõpetatakse. (Nelson ja Cox 2004)



Joonis 1 Ligandi seostumisel GPCRile dissotseerub G-valk retseptorilt. G-valgu α -alaühik eemaldub $\beta\gamma$ -dimeerist ning liigub edasi ja aktiveerib ensüümi AC mis katalüüsib ATP-st cAMPi tootmise reaktsiooni. L tähistab joonisel ligandi, GPCR on G-valguga seotud retseptor, AC on adenülaadi tsüklaas ja α , β ja γ tähistavad vastavaid G-valgu alaühikuid.

Tekkinud cAMPi kontsentratsiooni määramiseks on erinevaid meetodeid. Näiteks kasutatakse selleks radioaktiivselt märgistatud ^3H -adeniini, millest rakk toodab teiste adeniini derivaatide seas ka ^3H -cAMPi. Radioaktiivselt märgistatud cAMPi eraldamiseks tuleb rakud lüürida ja lüsaadist analüüdi määramiseks kasutatakse järjest asetsevaid ioonvahetus ja alumiiniumoksiidi

kolonne. See meetod on aeganõudev aga suure dünaamilise ulatusega ja saab määrata kuni nanomolaarset kontsentratsiooni (Donaldson *et al.* 1988). Ka lihtsamate antikehadel põhinevate meetodidega saab cAMPi kontsentratsiooni mõõta, kuid ka selliste meetodide kasutamiseks tuleb rakud enne lüüsida. Elus rakkudes cAMPi tekkimise jälgimiseks on kasutusele võetud erinevad biosensorid. Jaanimardika lutsiferaasil põhinev biosensor toodab lutsiferiinist oksülutsiferiini ning reaktsiooni käigus tekib cAMP ja eraldub valgus, mille intensiivsust saab mõõta. Lisaks lutsiferaasil põhinevale biosensorile on arendatud ka flouresentsvalkudel põhinevaid biosensoreid, millest räägitakse lähemalt Epac valgul põhinevate FRET biosensorite peatükis. (Hill *et al.* 2010)

MC4 retseptor

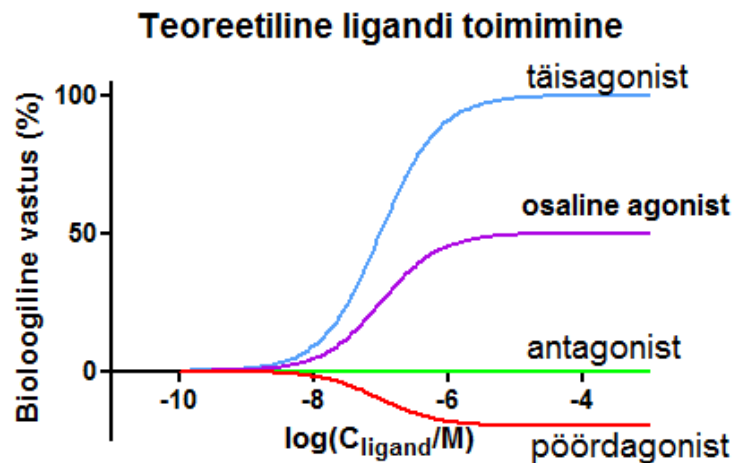
Melanokortiinse retseptori 4. alatüüp (MC4) on üks seni avastatud viiest melanokortiinsest retseptorist ning sarnaneb kõige rohkem 3. alatüüpiga (MC3). Melanokortiinsed retseptorid on kõige väiksemad GPCRde hulka kuuluvad retseptorid. Inimese MC4 retseptor koosneb kõigest 332 aminohappest. Võrdluseks, kõige suurem GPCR epidermaalse kasvufaktori (EGF)-sarnane valku 1 koosneb 3312 aminohappejäägist. (Latek *et al.* 2012). Melanokortiinsete retseptorite kaudu tekivad mitmed erinevad füsioloogilised vastused, millest tuntum on pigmentatsiooni regulatsioon nahas ja juustes, mida vahendab melanokortiinse retseptori 1. alatüüp. (Tao *et al.* 2010)

MC4 retseptor on peamiselt ekspresseeritud pea- ja seljaajus, kuid seda on leitud ka peenises (Chaki ja Okuyama 2005). Laialdase leviku tõttu on MC4 retseptoril mitmeid füsioloogiliselt olulisi funktsioone. Enim uuritud on MC4 retseptori mõju toitumisele ja energiahomöostaasile. On märgatud, et MC4 retseptori aktivatsioon suurendab energia kulutamist (kiirendab metabolismi) ja vähendab toidu tarbimist. MC4 retseptori mutatsioone seostatakse päriliku ülekaalulisusega. Samuti nähakse MC4 retseptori agoniste võimalike erektsioonihäirete ravimitena, kuna on märgatud, et seljaajus olevad MC4 retseptorid osalevad erektsiooniprotsessi regulatsioonis. Oma paljude funktsioonide vahendamise pärast nähakse MC4 retseptori ligande potentsiaalsete ravimitena nii ülekaalulisusele, seksuaalhäirete, sõltuvuse, meeleoluhäirete kui neuropaatilise valu jaoks. (Tao *et al.* 2010)

Kuna MC4 retseptor on võimeline seostuma kolme üldise G-valgu klassiga, G_{as} -iga, $G_{ai/o}$ ja $G_{aq/11}$ -iga, siis suutab MC4 retseptor lisaks cAMP signaalirajale aktiveerida ka mitogeen-aktiveeritava proteiinkinaaside (MPAK) signaalirada ning retseptori aktivatsioon tõstab ka rakusisest kaltsiumi kontsentratsiooni. (Tao *et al.* 2010)

Ligandid

Ligande võib liigitada päritolu alusel sünteetilisteks ja looduslikeks või toime alusel agonistideks, pöördagonistideks ja antagonistideks. Joonis 2 illustreerib agonistide, antagonistide ja pöördagonistide poolt tekitavat bioloogilise vastuse sõltuvust kontsentratsioonist. Agonistid tekitavad positiivse bioloogilise vastuse, kui tegemist on täisagonistiga siis tekib maksimaalne vastus kui aga osalise agonistiga, siis tekib maksimaalsest väiksem bioloogiline vastus. Pöördagonist vähendab retseptori basaalsel aktiivsust. Antagonistid ise ei kutsu esile füsioloogilist vastust, aga kuna need seostuvad retseptorile, siis blokeerivad teiste ligandide seostumise retseptorile. (Rosenbaum *et al.* 2009)



Joonis 2 Erinevate ligandiklasside toimimine bioloogilises süsteemis. Täisagonist kutsus esile maksimaalse vastuse, osaline agonist kutsus esile alla maksimaalse vastuse, antagonist ei kutsu esile bioloogilist vastust ning pöördagonist alandab bioloogilise vastuse taset alla basaalse taseme.

Melanokortiinsed retseptorid seovad melanokortiine, kehaomaseid peptiide mille hulka kuuluvad adrenokortikotroopne hormoon ning α -, β -, γ -melanotsüüte stimuleeriv hormoon (MSH). MC4

retseptor seob melanokortiinidest kõige väiksema afiinsusega γ -MSH-d, kuid kõige suurema afiinsusega ligandi kohta leiab vastandlikke andmeid. Kõige afiinsemaks peetakse nii α -MSH ($K_i = 641 \pm 105$ nM) kui ka β -MSH ($K_i = 376 \pm 91$ nM) (Schiöth *et al.* 1996). Melanotaan II (MT II) oli üks esimesi sünteetilisi ligande MC4 retseptorile ning see sünteesiti α -MSH põhjal. MTII on MC3 ja MC4 retseptorite täisagonist ning omab pikemat bioloogilist aktiivsust kui endogeene α -MSH. (Al-Obeidi *et al.* 1989).

Farmakoloogiliselt on MC4 retseptori ligandide jaoks oluline nelja aminohappeline järjestus His-Phe-Arg-Trp, mida peetakse tähtsaks bioloogilise aktiivsuse olemasolu jaoks. (Chaki ja Okuyama 2005).

Tabel 1 MC4 retseptori ligandide aminohappelased järjestused, tumedas kirjas on esile toodud nelja aminohappeline järjestus, mida peetakse tähtsaks bioloogilise aktiivsuse olemasolu jaoks. (Nickolls *et al* 2003, Szardenings *et al.* 2000)

MC4 retseptori ligandide aminohappelased järjestused
α -MSH: Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu- His-Phe-Arg-Trp -Gly-Lys-Pro-Val-NH ₂ ;
MTII: Ac-Nle-c[Asp- His-D-Phe-Arg-Trp -Lys]-NH ₂ ;
SHU9119: Ac-Nle-c[Asp- His-D-Nal-Arg-Trp -Lys]-NH ₂ ;
MS-05: Ser-Ser-Ile-Ile-Ser- His-Phe-Arg-Trp -Gly-Lys-Pro-Val-NH ₂ ;

Melanokortiinsed retseptorid on erilised, kuna neile on leitud kaks endogeensest antagonistist, aguuti ja aguuti-taoline peptiid, mida ühelegi teisele GPCR-ile ei ole leitud. On näidatud, et viimane võib teatud olukordades käituda ka pöördagonistina (Tao *et al.* 2010). MC4 retseptori sünteetiline antagonist SHU9119 põhineb aga sünteetilisel agonistil MTII. Antagonisti saamiseks vahetati välja seitsmendas positsioonis olev D-fenüülalaniin D-2'-naftüülalaniin vastu (Hruby *et al.* 1995).

Epac valgul põhinevad FRET biosensorid

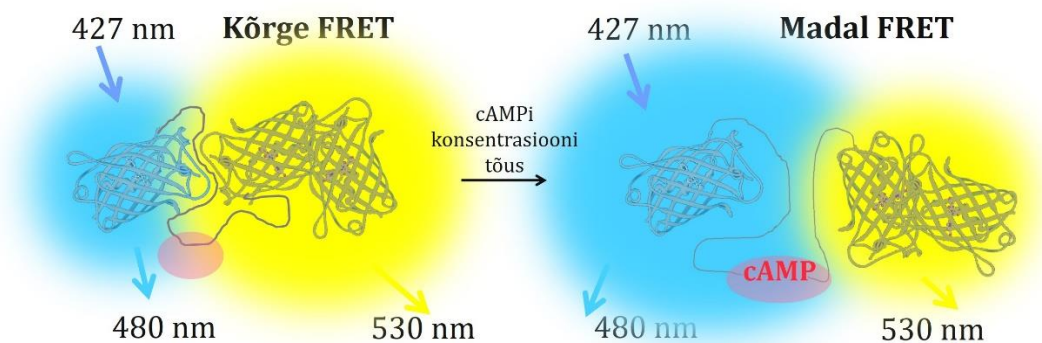
Försteri resonantsenergia ülekanne (FRET) on mittekiirguslik energiaülekanne doonorfluorofoorilt sobivale aktseptorfluorofoorile. FRETi toimumiseks on vaja täita kolm põhilist nõuet: fluorofoorid peavad olema üksteisele lähemal kui 10 nm, dipoolide

orientatsioonid peavad olema energia ülekandeks soodsad ning doonori kiirgusspekter peab piisaval määral kattuma aktseptori ergastusspektriga. FRETi efektiivsust arvutatakse vastavalt valemile:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad (1)$$

kus r on kaugus doonori ja aktseptori vahel ning R_0 on Försteri kaugus, ehk kaugus, kus energiaülekanne efektiivsus on pool maksimaalsest. R_0 väärtus sõltub doonori ja aktseptori dipoolide asetusest, doonori kiirgusspektri ja aktseptori ergastusspektri kattumisest, doonori kvantsaagisest ja aktseptori neeldumiskoeffitsiendist. (van der Krogt *et al.* 2008)

Epac-FRET biosensori tööpõhimõtte tugineb cAMPi sidumise tagajärjel valgukonstruktis toimuvale konformatsiooni muutusele, seda illustreerib joonis 3. Kui Epac ei ole cAMPi sidunud siis doonor ja aktseptor on üksteisele piisavalt lähedal, et FRET oleks väga efektiivne. Ergastades süsteemi doonorfluorofoori ergastusmaksimumile vastava valgusega domineerib sellisel juhul emissiooni signaal aktseptori lainepikkusel. Kui aga biosensor on cAMPi sidunud siis toimub konformatsioonile muutus, fluorofooride omavaheline kaugus ja orientatsioon muutuvad ja tingimused ei ole FRETiks soodsad, nii domineerib fluorestsentssignaal doonori lainepikkusel. (Ponsioen *et al.* 2004)



Joonis 3 Ergastades Epac-FRET biosensorit lainepikkusega (427 nm) olukorras kui sensor ei ole cAMPi sidunud, on fluorestsentsinensiivsus suurem doonori lainepikkusel (480 nm). Kui aga cAMP seotakse siis FRET efektiivsus väheeb ja fluorestsentsinensiivsus on seega suurem akseptori lainepikkusel (530 nm).

Esimesed cAMP efektorvalgud (Epac) põhinevad FRET bioseensorid töötati välja aastal 2004. Need olid geneetiliselt koderitavad biosensorid ja koosnesid geenijärjestustest, mis kodeerivad nii cAMPi siduvat domeeni kui ka fluorofoore. Fluorofooridena kasutati sinise fluorestsentsvalguga ja kollase fluorestsentsvalguga (CFP-YFP) paari. cAMPi siduva osana kasutati nii Epac2 valku, osa Epac1 valgust kui ka tervet Epac1 valku, mis muudeti katalüütiliselt inaktiivseks ning millele eemaldati ala, mis vahendab membraanile kinnitumist. Nii saab biosensor raku sees ühtlaselt jaotuda. (Klarenbeek *et al.* 2015)

Algsel fluorestsentsvalkude CFP-YFP paaril oli aga mitmeid puudusi, CFP lai kiirgusspekter kattub osaliselt YFP kiirgusspektriga, mis suurendab kollase kanali intensiivsust ka siis, kui FRET ei toimu. Lisaks toimub YFPga UV-valgusega ergastamisel fotokromismi nähtus ja kollase kanali intensiivsus tõuseb kuni 10%. Samuti on YFP pH tundlik, mille tõttu erinevatel pH-del on YFP fluorestsentsintensiivsus erinev. Ka moodustavad YFP ja CFP dimeere, mis aga vähendab FRET-i efektiivsust. Sellepärast hakati arendama uusi FRET paare, kus võeti kasutusele uued fluorestsentsvalgud, millel olid varasemast erinevad spektraalsed omadused. Nii asendati YFP uue fluorestsentsvalguga Venusega, millel on väiksem pK_a väärtus ja seega on see pH kõikumise suhtes vähem tundlikum, kuid mis võib siiski dimeeriseeruda. Aktseptori ja doonori vahelise kauguse vähendamiseks loodi uus fluorestsentsvalk Δ CFP, millel on võrreldes CFP valguga C-terminalist eemaldatud üksteist aminohapet. FRET efektiivsuse kolmanda komponendi, dipoolide asetuse, parandamiseks kasutati Venuse orientatsioonilist mutanti cp^{173} Venus (cp – tsirkulaarne permutatsioon), mille C- ja N-terminali asukohta on muudetud. Kasutatakse ka tandemaktseptorit, kus kaks aktseptorfluorestsentsvalku on asetatud üksteise järel. Nii vähendatakse valkude iseeneslikku dimeerisatsiooni ja parandatakse neeldumise efektiivsust. Lisaks sellele on niiviisi suurem tõenäosus, et saavutatakse optimaalne dipoolide orientatsioon, kuna tandem koosneb kahest fluorestsentsvalgust, mille dipoolid on erisuunaliselt orienteeritud. Doonori kiirgust aktseptori kiirgumise alas üritati vähendada aga punase fluorestsentsvalguga (RFP) ja selle edasiarenduste aktseptorina kasutusele võtmisega. Kuna ka doonori kiirgumise ja aktseptori ergastusspektrite kattumiseala vähenes, siis üritati seda kompenseerida rohelise fluorestsentsvalguga (GFP) doonorina kasutuselevõttuga. (van der Krogt *et al.* 2008)

Muudatusi on tehtud ka Epac osas (ehk sensori piirkonnas, mis seob cAMPi), et saada kõrge afiinsusega sensor. Muutes 270 asendis glutamiin glutamaatiks on märgatud cAMPi sidumisel afiinsuse suurenemist kuni 2,5 korda. (Klarenbeek *et al.* 2015)

Erinevad FRETi mõõtmise moodused vajavad natuke erinevate parameetritega FRET paare. Fluorestsentseluea mõõtmine on meetod, kus jälgitakse doonori fluorestsentseluea muutust, mida põhjustab FRET, ja sellepärast ei ole akseptorfluorofoori kiirgus tingimata vajalik (Wallrabe and Periasamy 2005). Fluorestsentseluea mõõtmise jaoks töötati välja pime (ingl. k. *dark*) aktseptor, mis ainult neelab doonori poolt ülekantud energiat, kuid ise valgust ei kiirga. Pime aktseptor on kasulik kuna on võimalik kasutada doonori ergastusspektri mõõtmiseks tervet spektriala. Samuti saab pimedas aktseptoriga biosensori kasutamise korral mõõta kahe või enama sensori eluiga samal ajal, kasutades fluorestsentseluea mõõtmise meetodit ja erinevate kiirgusspektritega doonoreid. (Klarenbeek *et al.* 2015)

Kokkuvõtvalt on Epac valgul põhinevaid cAMP biosensoreid arendatud üle kümne aasta. Hetkel on valikus järgmised biosensorid: Epac2-camps (Nikolaev *et al.* 2004), Epac1 valgul põhinevad esimese (Ponsioen *et al.* 2004), teise (van der Krogt *et al.* 2008), kolmanda (Goedhart *et al.* 2010) ning neljanda põlvkonna sensorid (Klarenbeek *et al.* 2015).

Käesolevas töös kasutati neljanda põlvkonna sensorit H188 (Epac-S^{H188}) (Klarenbeek *et al.* 2015), kus doonoriks on mTurquoise2, mis oluliselt heledam ja fotostabiilsem, kui varem kasutatud CFP. Kuna doonor on eelevast heledam, siis ei pea seda ergastama nii intensiivse valgusega, mis vähendab fototoksilisust. Suurem fotostabiilsus lubab mõõtmisi kauem teostada. Aktseptoriks on cp¹⁷³Venus tandem. Venus valgu kasutamine võimaldab mõõtmisi stabiilselt teostada väiksestest pH muutustest sõltumatuna. Kahest valgust koosnev tandem võimaldab FRET efektiivsust aktseptorile ning tsirkulaarselt permuteeritud valgu vorm tagab ülekandel optimaalsema dipoolide orientatsiooni. (Klarenbeek *et al.* 2015)

BacMam tehnoloogia

Geneetiliselt kodeeritud biosensori kasutamiseks tuleb esmalt biosensori geen viia elus rakkudesse. Selleks on mitmeid meetodeid, millest enim kasutatud on lühiajalised transfektsiooni meetodid, ehk meetodi, kus võõr-DNA viiakse rakku ja selle informatsiooni abil

ekspresseeritakse soovitud valku, kuid DNA ei sisene raku genoomi ja seetõttu ei kandu võõr-DNA raku jagunemisel edasi. Lühiajalise transfektsiooni korral kasutatakse erinevaid DNA-d rakkudesse toimetavaid reagente, nagu kaltsiumfosfaat, dietüületanoolamiin-dekstraan, polüetüleenimiin, mis on enamasti positiivselt laetud ja seetõttu läbivad paremini negatiivselt laetud fosfolipiidset kaksikkihti. Samuti kasutatakse mehaanilisi meetodeid nagu näiteks mikrosüstimist, kus DNA süstitakse otse rakku või elektrilisi meetodeid nagu elektroporatsiooni, kus elektriga tekitatakse membraani poorid, kust DNA saab rakku siseneda. (Luo ja Saltzman 2000)

Käesolevas töös kasutati imetajarakkudesse geeni viimiseks BacMam tehnoloogiat, mis põhineb modifitseeritud bakuloviirustel. Need on viirused, mis nakatavad nii putuka kui ka imetaja rakke, aga paljuneda suudavad ainult putuka rakkudes ning geeniekspressioon toimub ainult imetaja rakkudes. See toimib nii kuna geenijärjestus, millest valku toodetakse on asetatud tsütomegaloviiruse promootori järele, spetsiifiline DNA järjestus, kust alustatakse transkriptsiooni. Seda promootorit tunnevad ära vaid imetaja rakkudes esinevad valgud. Viiruse paljunemiseks vajalik geenijärjestus on asetatud aga sellise promootori järele, mille tunnevad ära putukarakud. Seega on rekombinantset DNA-d sisaldavaid viiruseid võimalik toota ja paljundada putuarakkudes, kuid kasutust leiavad need viirused geenide transportijatena imetajarakkudes. Seda süsteemi on rakendatud nii GPCRide, ioonkanalite kui ka tuuma retseptorite ekspresseerimiseks mitmetes rakuliinides. (Kost *et al.* 2010)

BacMam süsteemiga saab geeniekspressiooni taset reguleerida muutes viiruse kogust või lisades kemikaale, nagu näiteks naatriumbutanaat (NaBu), mis takistavad DNA-l histoonidele keerdumist ja seega soodustavad geeniekspressiooni. Bakuloviirused on võimelised vastu võtma kuni 38 000 aluspaari suurusi DNA lõike ilma, et geeniekspressioonis tekiks viga. Sellepärast on BacMam süsteem sobilik kodeeritud biosesortite viimiseks imetajarakkudes. (Kost *et al.* 2010)

EKSPERIMENTAALNE OSA

Materjalid ja töövahendid

Uue põlvkonna Epac sensori pcDNA saadi kingituseks prof Kees Jalinkilt. DH5 α E. coli rakud, DH10BacTM E. coli rakud ja pFastBacTM1 vektor on ostetud Invitrogen Life Technology-st. Thermo Scientificust osteti kloonimiseks vajalikud ensüümid FastAP, T4 ligaasi, FastDigest RruI, FastDigest EcoRI, EcoRI ja SnaBI ning puhvrid FastDigest Green (koostis on tootja poolt avaldamata) ja Tango (33 mM Tris-atsetaat, 10 mM magneesiumatsetaadi, 66 mM kaaliumatsetaati, 0,1 mg/ml BSA). Samuti polüetüleenglükool (PEG 4000). Antibiootikumid kanamütsiini, gentamütsiin (Gibco) tetratsükliini (Sigma-Aldrich) ning ampitsilliin (AppliChem). SOC baktrisööde valmistati meie laboris, 100 ml söötme tegemiseks kasutati kasutades 2 g trüpton (LAB M), 0,5 g pärmiekstrakt (LAB M), 0,2 ml 5 M NaCl (AppliChem), 0,25 ml 1 M KCl (AppliChem), 1 ml 1 M MgCl₂ (AppliChem), 1 ml 1 M MgSO₄ (AppliChem), 2 ml 1 M glükoosi (Kebo).

Sf9 putukarakke (Invitrogen Life Technologies) kasvatati Ex-CellTM 420 (Sigma-Aldrich) seerumivabas söötmes. Rakkude elumust mõõdeti trüpaansinise (Sigma-Aldrich) 0.4% lahusega DPBSis (Naxo) kasutades rakuloendurit TC10TM Automated Cell Counter (Bio-Rad Laboratories).

Rekombinantset MC4 retseptorit ekspresseeriv CHO-K1-MC4R rakuliin loodi 2007 aastal Santa Veikšina poolt meie töörühmas. Rakke kasvatati Dulbecco modifitseeritud Eagle söötmes (DMEM) (Sigma-Aldrich) kuhu oli lisatud 10% veiseloote seerumit (FBS) (Sigma-Aldrich), 100 UI/ml penitsilliini (Naxo), 100 µg/ml streptomütsiini (Naxo) ja 400 µg/ml genetitsiini (G418) (BioTop). Rakkude Petri tassilt eemaldamiseks kasutati trüpsiini (PAA Laboratories). Rakke kasvatati inkubaatoris 5%-lise CO₂-ga 37 °C juures. Rakkude konfluentsuse hindamiseks kasutati Olympus CKX31 mikroskoopi.

Spektromeeter Nanodrop 1000-ga (Thermo Scientific) määrati DNA konsentrtsiooni ja puhtust. Spektromeeter mõõdab valguse neeldumist lainepikkustel 260 nm, kus neelab DNA, ja 280 nm, kus neelavad aromaatsed aminohapped. Saadud intensiivsuste suhte järgi saab määrata puhtust,

suhet üle 1,8 peetakse puhtaks. Lambert-Beeri seaduse abil saab määrata kontsentratsiooni, kuna teada on neelduvus, optilise tee pikkus ja molaarne neeldumistegur.

Fluorentsentsintensiivsuse mõõtmised viidi läbi plaadilugejaga Synergy™ NEO (BioTek) kasutades ergastusfiltrit 430 nm ja kiirgusfiltrid 480 nm sinine kanal ja 530 nm kollane kanal. Rakude pildistamiseks kasutati mikroskoopi Cytation™ 5 (BioTek) objektiiviga Olympus UPLFLN 4X. Fluorestsentspiltide tegemiseks ergastati LEDiga lainepikkusel 465 nm sinises alas ja 523 nm kollases alas.

MC4 retseptori ligandid MTII, MS-05, α -MSH, H-6268, RO27-322 (Bachem AG), β -MSH, NDP- α -MSH (AnaSpec), Cy3B-MTIIa (sünteesiti eritellimusel) lahuste valmistamisel lisati Pluronic F-127 (Sigma-Aldrich), et vältida ligandide kleepumist plastiku pinnale.

Tabel 2 Töös kasutatud ligandide aminohappelased järjestused

MTII: Ac-Nle-c[Asp-His-D-Phe-Arg-Trp-Lys]-NH ₂ ;
MS-05: Ser-Ser-Ile-Ile-Ser-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH ₂
α -MSH: Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH ₂
H-6268: Ac-D-Arg-Cys-Glu-His-D-Phe-Arg-Trp-Cys-NH ₂
RO27-3225: butanoüül-His-Phe-Arg-Trp-Sar-NH ₂ ;
β -MSH: Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-OH;
NDP- α -MSH: Ac-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-D-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH ₂ ;

Biosensori kloonimine

Transforeerimine DH5 α rakkudesse

Kõik kloonimise etapid viidi läbi järgides Invitrogen Life Technologies Bac-to-Bac® eeskirja. DNA saabus tilgana filterpaberil, paberist lõigati märgitatud tükk, mida elueeriti 10 μ l milliQ veega. Esmalt viidi pcDNA DH5 α rakkudesse kasutades kuumašoki meetodit. See on meetod, kus kiire temperatuuride erinevuse tõttu tekkivad bakterite membraani poorid, kust DNA saab rakku sisendada. RbCl töödeldud baktereid hoiti jääl ja neile lisati kogu filterpaberilt elueeritud pcDNA, oodati viis minutit ja teostati kuumašokk – hoiti 30 sekundit 42 °C juures. Pärast seda hoiti rakke kaks minutit jääl, et kõrge temperatuuri tõttu tekkinud poorid sulguksid ning seejärel

lisati 500 µl SOC bakterisöödet. Segu pandi 37 °C ja 220 rpm-i juurde umbes 30 minutiks järelinkubeerima. Samal ajal valmistati ette külviplaat (2% agari (Invitrogen) lahus LB (Luria-Bertani) söötmes (AppliChem), 50 mg/ml ampitsilliin Petri tassil), millele hiljem kanti 100 µl bakterisuspensiooni, mis hõõruti steriilise klaaspulgaga laiali. 24 tunni pärast oli kolooniaid aga liiga palju ning ühte kolooniat ei suudetud teistest eraldada, sellepärast teostati külv uuesti külvates plaadile 20 µl segu. Segu säilitati -20 °C juures. 24 tundi pärast plaadile kandmist valiti välja üks koloonia, mis viidi 5 ml LB söötmesse koos 50 mg/ml ampitsilliiniga. Baktereid kasvatati 37 °C ja 220 rpm juures 23 tundi, pärast seda puhastati DNA välja kasutades GeneJET Plasmid Miniprep Kiti (Thermo Scientific). DNA puhastamiseks kõigepealt lüüsi rakud leeliselise lahusega siis neutraliseeriti happelise lahusega. Kohev valge sade tsentrifuugiti, selle kohal olev lahus aga kanti spinnkolonni. Etanooli lahusega pesti kolonnist välja lisandid ning hiljem 40 µl vesilahusega elueeriti puhas DNA. DNA puhtus ja konsentrasiooni määrati NanoDrop 1000 spektromeetriga. H188 pcDNA puhtuseks saadi 1,86 ($I_{260\text{nm}}/I_{280\text{nm}}$) ja kontsentratsiooniks saadi 731 ng/µl. Seega oli saadud H188 pcDNA kõrge puhtusega ja protsess kulges võrdlemisi kõrge saagisega.

Restrikteerimine

Järgnevalt toimus H188 biosensori geeni viimine pFastBacTM1 vektorisse. Selleks lõigati H188 pcDNA-d FastDigest RruI ja FastDigest EcoRI ensüümidega FastDigest Green puhvris. Jooniselt 4 on näha kohad kus toimub nende ensüümide seostumine DNA plasmiidile ning vektori avamine. Restriktsioonisegu oli kokku 20 µl – 14 µl milli-Q vett, 2 µl DNA, 2 µl 10X puhvrit ja 1 µl mõlemat ensüümi. Segu inkubeeriti 20 minutit 37 °C juures. pFastBac vektorit lõigati EcoRI ja SnaBI restriktsiooniensüümidega. Sellesse restriktsioonisegusse lisati 14 µl milli-Q vett, 2 µl DNA, 2 µl 10X Tango puhvrit ja 1 µl SnaBI ensüümi, inkubeeriti üks tund 37 °C juures ning siis lisati veel 2 µl 10X Tango puhvrit ja 1 µl EcoRI ensüümi. Seejärel inkubeeriti segu 37 °C juures 1 tund ning pärast seda inaktiveeriti ensüümid kuumutades neid 20 minutit 65 °C. pFastBacirestriktsioonisegusse lisati 1 µl temperatuuri tundliku aluselist fosfataasi (FastAP) ja inkubeeriti 30 min 37 °C juures, et eemaldada 5'- ja 3'-fosfaatrühmad lõigatud DNA ahelas. FastAP desaktiveeriti kuumutades 5 min 75 °C juures. Restriktsiooniproduktid eraldati

geelelektroforeesil. Kuna biosensori lõikamisel tekkinud fragmendid on suuruselt väga sarnased, siis tuli nende eraldamisel kasutada madalat pinget ja väikese tihedusega agarosgeeli. Tuginedes varasematel kogemustele otsustati teha 0.8% agarosgeel (Sigma-Aldrich) Tris-atsetaat-etüleendiamiintetraetaanhape (TAE) puhvris, kuhu lisati DNA hilisemaks visualiseerimiseks 2 µl etiidiumbromiidi (10 mg/ml) pinge oli 30 V ja eraldusajaks oli 6 tundi.

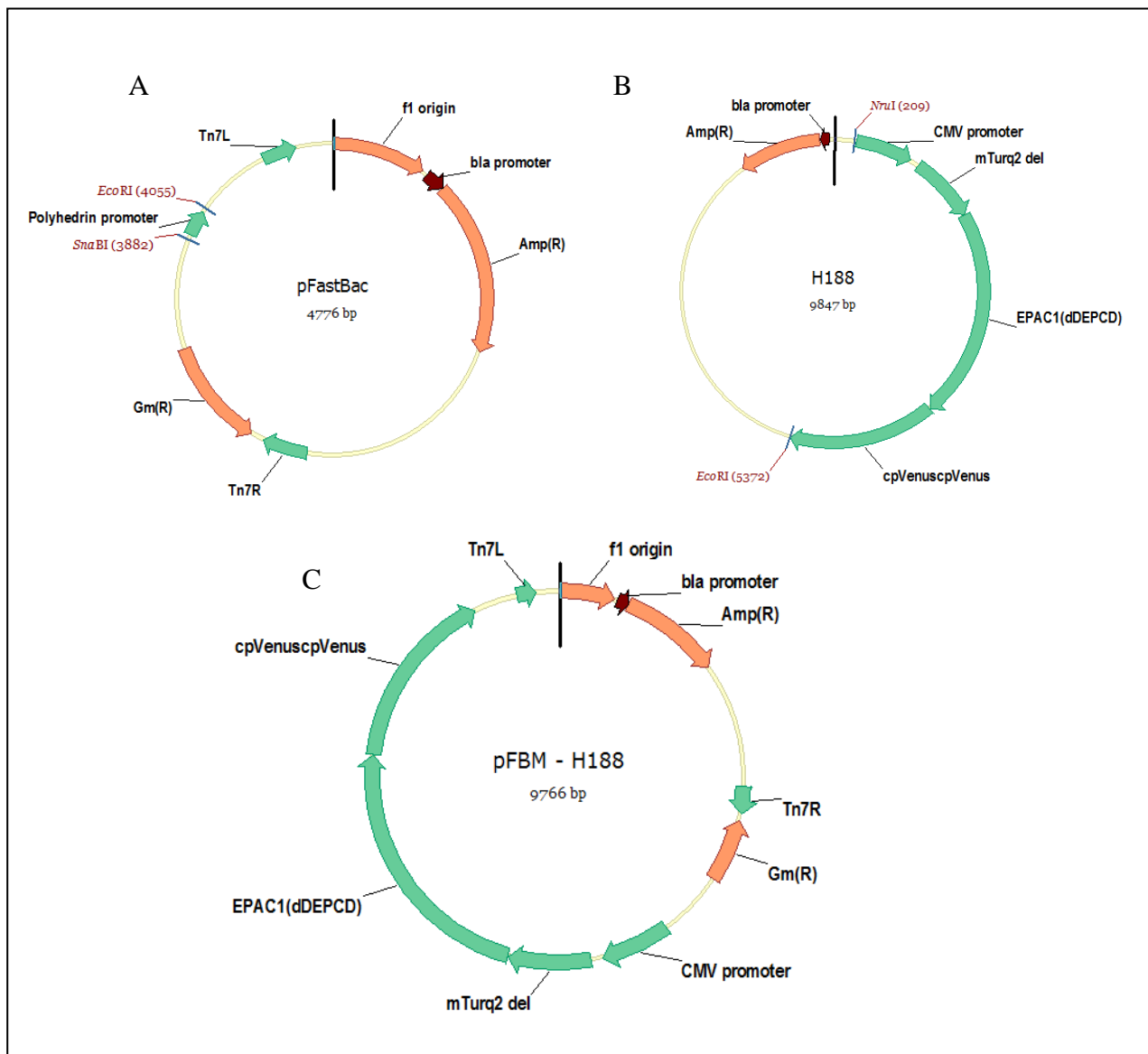
pFastBacTM1 ja H188 biosensori ligeerimine

Järgnevalt toimus vajalike DNA fragmentide geelist välja lõikamine ja puhastamine, kasutades Silica Bead DNA Gel Extraction Kiti (Thermo Scientific). Geel lahustatakse 55 °C juures sidumispuhvris, seejärel lisatakse silikapulbri lahus, millele optimaalse pH korral DNA seondub. Silikapulbrit pestakse etanooli lahusega et eemaldada lisandid ja lõpuks veega et elueerida DNA. Saadud fragmendid ligeeriti 17 °C juures üleöö. Ligeerimisseguga koosnes 10 µl doonor fragmendi ehk biosensori lahusest, 4,5 µl aktseptorfragmendi ehk pFastBacI lahusest, 2 µl 10X ligeerimispuhvrit, 2 µl Polüetüleenglükool (PEG 4000) ja 1,5 µl T4 ligaasi lahusest. T4 ligaas on ensüüm, mis katalüüsib 5'-fosfaat ja 3'-hüdoksüülotsad fosfodiester sidemete moodustamist ja PEG 4000 soodustab seda protsessi. Ligeerimisseguga transformeeriti eelnevalt kirjeldatud protokollil DH5α rakkudesse.

Rekombinantse BacMam bakmiidi tegemine

Järgmisena paljundati pFastBac-H188 vektor DH5α rakkudes üles ning puhastati nagu eelnevalt kirjeldatud. pFastBac-H188 vektor saadi 50 µl kontsentratsiooniga 540 ng/µl ning rekombinantne geenijärjestus sekveneeriti Tartu Ülikooli Molekulaar Instituudi tuumiklabori spetsialistide poolt. Saadud järjestust analüüsiti programmiga „Nucleotide BLAST“ (National Center for Biotechnology Information). Järjestuses mutatsioone ei leitud. Edasi klooniti pFastBac-H188 DH10BacTM kompetentsetesse bakterirakkudesse, kasutades eelnevalt kirjeldatud transformeerimise protokollil. Erinevus oli bakterite eelinkubatsiooni ajas SOC söötmes, mis oli eelneva 30 minuti asemel 5 tundi. Kolooniaid kanti 2%-le agari segule plaadile, kuhu oli lisatud 50 µg/ml kanamütsiini, 10µg/ml tetratsükliini, 7 µg/ml gentamütsiini, 100 µg/ml X-gali ja 40 µg/ml IPTG, mis kõik aitavad selekteerida kolooniaid, kus on soovitud geen. Gentamütsiini resistentsus

tuleneb pFastBac vektorist ning kanamütsiini ja tetratsükliini resistentsus tuleneb DH10BacTM rakkudest. Baktereid kasvatati 48 tundi, kuni olid näha siniseid ja valgeid kolooniad. X-gal on värvitu laktoosi analoog, mida võib lõhustada β -galaktosidaas, moodustades produktina erksinise lahustumatu pigmendi. Rakkudes, kus soovitud geenijärjestus on bakteriraku genoomi sisenenud on β -galaktosidaasi geenijärjestus lõhutud (transgeen asetub edukal kloneerimisel täpselt keset galaktosidaasi ensüümi kodeerivat geenijärjestust). Nii tekivad külviplaadile valged kolooniad, milles on soovitud DNA raku genoomi sisenenud ning ka sinised kolooniad kus DNA ei ole genoomi sisenenud. Plaadilt valiti üks valge koloonia ja kanti uuele külviplaadile, selle käigus tehti kindlaks, et ka tütar kolooniad on valged. Kui 48 tunni pärast olid ka järgmised kolooniad valged, siis paljundati valitud bakterikoloonia 3 ml LB söötmes koos kanamütsiini, tetratsükliini, gentamütsiiniga üles ja DNA puhastati kasutades FavorPrepTM Endotoxin Free Plasmid DNA Extraction Midi Kit (Favorgen), selle töö põhimõte on sarnane Miniprep Kiti omaga. Kuna bakmiid ehk rekombinantne Sf9 rakkude genoom on väga suur, siis ei kasutata puhastamisel spinnkolonne, kuna need ummistuksid. DNA kontsentratsiooniks määrati 1915 ng/ μ l.



Joonis 4 Töös kasutatud plasmiidid. Pildil **A** on toodud FastBaci plasmiid, milles restrisiooni käigus eemaldatakse polühedriini promootor (*polyhedrin promoter*), mis on putukarakkude promootor. Alles jäävad *f1* origin, mis on vajalik bakterites DNA replikatsiooni alustamiseks, *bla* promotor, mis hakkab ampitsiliini resistentsust (*Amp*(R)) kodeerima. Lisaks jääb sisse gentamütsiin resistentsus (*Gm*(R)), transposoonide regioonid *Tn7R* ja *Tn7L*, mis on vajalikud võõr-DNA vastuvõtmiseks kompetentsete bakterirakkude genoomi. Pildil **B** on biosensori plasmiid, kus biosensori osa (*mTurq2 del-EPAC1(dDEPCD)-cpVenuscpVenus*) on asetatud tsütomegaloviiruse promootorit (*CMV promoter*) järel, et geen ekspresseeruks imetaja rakkudes. *RruI* ja *EcoRI* ensüümidega lõigatakse plasmiidist välja eelmainitud osad. Pildil **C** on toodud ligeermimise tulemusena saadud pFastBac-H188 plasmiid, kus on nää *Tn7R* ja *Tn7L* transposoomide vahele jääv ala, mis hilisemal transformeerimisel liitub DH10BacTM rakkude genoomiga. Plasmiidist bakuloviirusdesse ei tule kaasa bakteri rakkudes DNA replikatsiooniks vajalik promootor (*f1* origin) ning ampitsiliini resistentsus (*bla* promotor ja *Amp*(R)).

BacMam viiruse tootmine

Rekombinantne H188 BacMam bakmiid transfekteeriti Sf9 putukarakkudesse, kasutades polüetüleenimiidil põhinevat transfektsioonireagenti ExGen500 (Fermentas). 2 µg H188 bakmiidi lisati 200 µl NaCl (150 mM) lahusele ja segati, seejärel lisati 10 µl transfektsioonireagenti ExGen500 ja inkubeeriti 10 minutit. Järgnevalt lisati transfektsioonisegu 6-kohalise plaadi süvendisse, kuhu oli eelneval päeval külvatud 300 000 rakku. 5 päeva pärast nakatamist pipeteeriti rakud süvendist lahti ja lisati koos rakkude kohal olnud söötmega 50 ml Erlenmeyeri kolbi, kuhu oli eelneval päeval külvatud 4 ml Sf9 rakke tihedusega $1,5 \cdot 10^6$ rakku/ml. Viiruse suspensiooni esimene amplifikatsioon ehk P1 koguti kolmandal päeval, kui Sf9 rakkude elumus oli langenud alla 50%. Kogumiseks tsentrifuugiti rakususpensiooni 10 min 3000 rpm juures, supernatant (sademe kohal olev lahus) alikvooditi 500 µl kaupa ja säilitati -90 °C juures. Teise amplifikatsiooni jaoks võeti 400 µl P1 viirust, see lisati 40 ml Sf9 rakkudele tihedusega $2 \cdot 10^6$ rakku/ml. P2 viirus koguti sammuti kolmandal päeval. Rakkude elumuseks määrati 38%. Lahus tsentrifuugiti samadel tingimustel, supernatant alikvoodidi 1 ml kaupa ning säilitati -90 °C juures. P3 viiruse tegemiseks nakatati 80 ml Sf9 rakke tihedusega $2,6 \cdot 10^6$ rakku/ml 360 µl P2 viirusega ehk MOI 0,1-ga. Viirus koguti kui elumus oli keskmiselt 41% ja alikvoodid 1 ml kaupa ning säilitati -90 °C juures. P3 viirust tehti ka juurde nakatades MOI 0,1-ga 40 ml Sf9 rakke, mille tihedus oli 2,3 miljonit rakku/ml. See kord alikvoodidi 20 ml 1 ml kaupa ja külmutati -90 °C juurde ülejäänud viirus säilitati 4 °C juures.

Viiruste tiitrimine ICSE meetodil

P2 ja P3 viirustele määrati tiiter ehk nakatusvõimeliste viirusosakeste kontsentratsioon. Selleks kasutati pildianalüüsil põhinevat rakkude suuruse hindamise (ICSE) meetodit (Laasfeld 2016). Meetod lähtub nähtusest, et viirusega nakatunud rakkude diameeter on suurem, kui nakatamata rakkude diameeter. 24-kohalisele plaadile külvati 200 000 rakku süvendi kohta ja oodati kuni 30 minutit nende kinnitumist, siis lisati igasse süvendisse viiruse seerialahjendust. Seerialahjenduste tegemisel lahjenes iga järgnev suspensioon 3 korda, lisati ka tühiproov. 24 tundi pärast nakatamist tehti igast süvendist 4 pilti, kasutades Cytation™ 5-te Olympus UPLFLN 4X objektiivi. Diameetri arvutamiseks piltidelt kasutati andmetöötlus programmi Aprecium tööriista ICSE tools. Saadud tulemused kanti graafikule, kus y-teljel on rakudiameeter µm-des ja x-teljel on logaritmi lahjendusfaktori pöördväärtusest. Andmeid analüüsiti kolmeparameetrilise

logistilise funktsiooniga ning saadud EC₅₀ väärtuse abil arvutati viiruse kontsentratsioon ehk nakatamisvõimeliste viirusosakeste arv (ivp) ml-is. Selle arvutamiseks kasutati valemit:

$$C_{viirus} = \frac{50\% \text{ maksimaalselt nakatunud rakkudest}}{EC_{50} \times V_{lahus}} \quad (2)$$

kus V_{lahus} on lahuse ruumala, EC₅₀ väärtus on pool maksimaalsest efektiivsest viirusosakeste kontsentratsioonist ja 50% maksimaalselt nakatunud rakkudest on süvendisse kantud rakkude arv, tulemus saadakse ühikuga ivp/ml.

CHO-K1-MC4R rakkude nakatamine ja katse käik

Enne nakatamist kasvatati rakke Petri tassil, kuni oli saavutatud 90-100% konfluentsus. Seejärel võeti rakud trüpsiiniga Petri tassilt lahti ja lisati 2 ml DMEM söötmega viiruse suspensiooni. Viiruse suspensioon koosnes 2 ml H188 P3 viirusest, 10 ml DMEM kasvusööttest ning 10 mM-st NaBu (Sigma-Aldrich). Viiruse lahus koos rakkudega kanti mustale 96 süvendiga läbipaistva põhjaga rakukultuur plaadile (Corning B.V. Life Sciences), 100 µl igasse süvendisse ning inkubeeriti üleöö 30 °C juures. Enne mõõtmise algust aspireeriti rakkudelt lahus, kuna see oleks oma punase värvuse tõttu (söötme pH indikaator fenoolpunane) mõõtmist seganud, ja süvendid pesti üks kord DPBS puhvriga läbi. Enne esimest mõõtmist pandi igasse süvendisse 90 µl DPBS puhvrit ja pärast esimese mõõtmise teostamist lisati igasse süvendisse 10 µl 10X ligandi lahust, EDTA (Merk) katsete korral oli EDTA seerialahjendused tehtud kindla kontsentratsiooniga ligandi lahuses. Mõõtmised teostati triplikaatides ja korduskatsed viidi läbi erinevatel päevadel.

Andmeanalüüs

Andme töötlemiseks kasutati Apareciumit ning graafiliseks esitamiseks programmi GraphPad Prism™ 5.04. ΔFRET arvutamiseks kasutati valemit (Mazina *et al.* 2012) :

$$\Delta FRET = \frac{\frac{I_{t=0}^{530 \text{ nm}}}{I_{t=0}^{480 \text{ nm}}} - \frac{I^{530 \text{ nm}}}{I^{480 \text{ nm}}}}{\frac{I_{t=0}^{530 \text{ nm}}}{I_{t=0}^{480 \text{ nm}}}} \quad (3)$$

kus $I_{t=0}^{580\text{nm}}$ ja $I_{t=0}^{480\text{nm}}$ on intensiivsus vastavalt kollases ja sinises kanalis enne ligandi lisamist ja $I^{580\text{nm}}$ ja $I^{480\text{nm}}$ on samade kanalite intensiivsused ajahetkel t. Käesolevas töös analüüsiti vastust ajahetkel 30 minutit pärast ligandi lisamist.

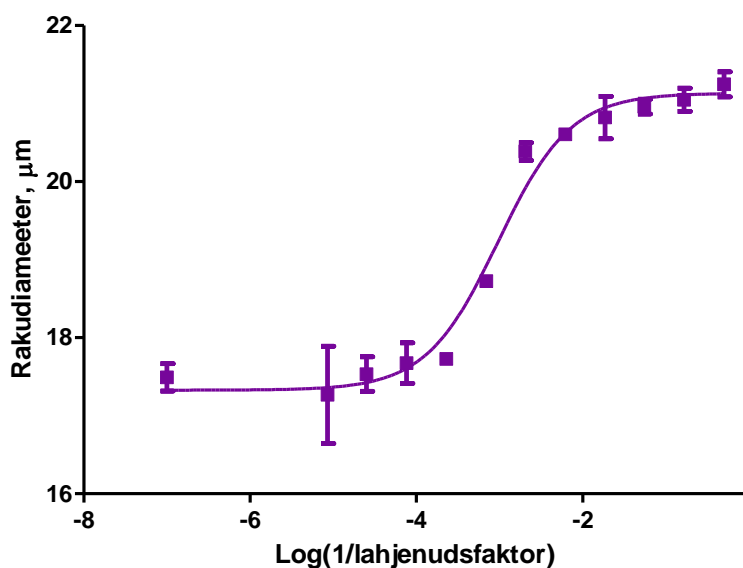
TULEMUSED JA ARUTELU

Viiruse tiitri määramine

Et teada erinevate viiruste kasutamise vahetavate nakatavate imetajarakkude suhtes, määrati BacMam viirustele tiitrid. Jooniselt 5 võib näha, et P3 ja P2 viiruste graafikud on väga sarnased ja ka numbrilised tulemused tabelis 1 samas suurusjärgus ning seega on antud viiruste kontsentratsioonid sarnased. -90°C juures hoitud viirus kaotas külmutus- ja sulatusprotsessi käigus ligi suurusjärgu oma nakatusvõimekusest. Nii tehti ühelt viiruselt teisele üle minnes nakatamiseks vajaminevas viirusekoguses parandusi.

Tabel 3 Viiruste tiitrid ehk kontsentratsioonid ühikuga nakatus võimelist osakest ml-s.

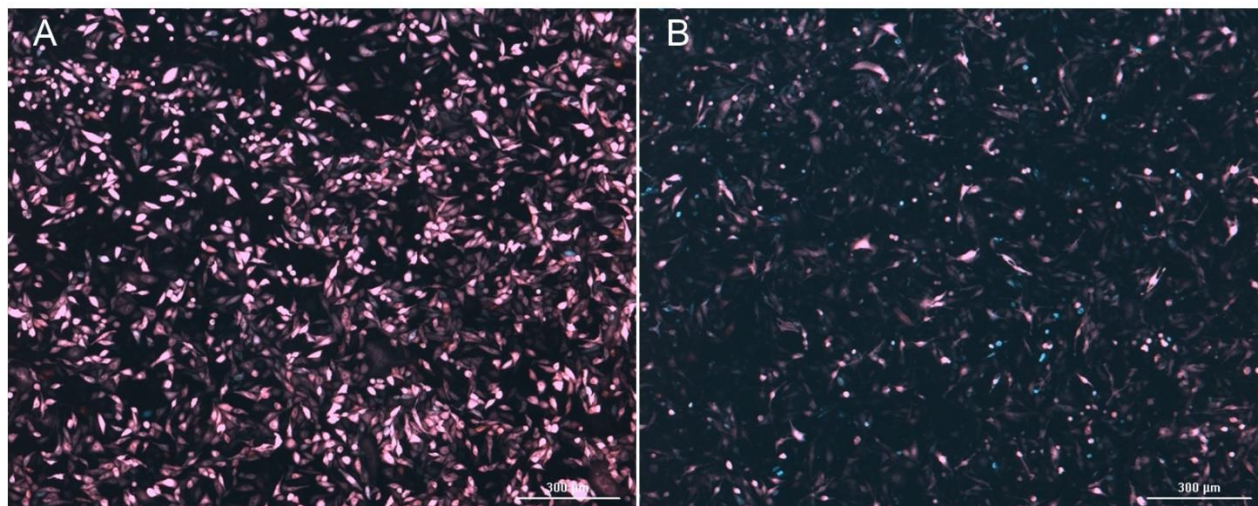
Viirus	H188 P3 (-90 °C)	H188 P3 (4 °C)	H188 P2 (-90 °C)
Tiiter (ivp/ml)	$4 \cdot 10^8$	$1,38 \cdot 10^9$	$2,08 \cdot 10^8$



Joonis 5. Rakudiametri muutuse sõltuvus viiruse kontsentratsioonist. Joonisel on toodud ICSE meetodiga viiruse kontsentratsiooni määramiseks väljalik eksperimentaalandmete graafik P3, kust leiti EC_{50} väärtus. Viirust amplifitseeriti 3 korda, esmast P1 amplifikatsioonil kontsentratsiooni ehk tiitrit ei määratud. Teine amplifikatsioon P2 säilitati -90°C juures ja sellel määrati tiiter. Teiste viiruste graafikud olid analoogsed P2 viiruse omale.

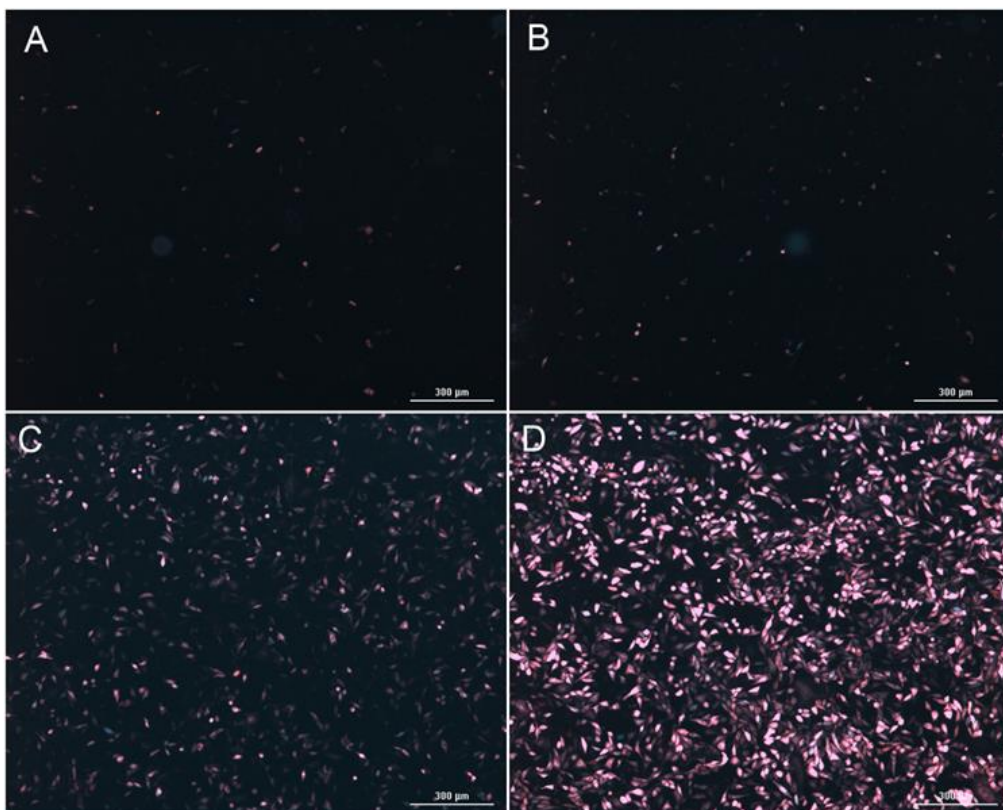
Nakatamisprotsessi optimeerimine

Et saavutada töötamiseks optimaalne biosensori tase, oli vajalik optimeerida nakatamise ja valgust ekspressiooni parameetreid. Rakud kanti enne nakatamist 96 süvendiga katseplaadile ja oodati rakkude kinnitumist 30–45 minutit. Seejärel nakatati rakud viiruse suspensiooniga, ning oodati kolm tundi. Seejärel asendati viiruse suspensioon rakusöödemega, kuhu oli lisatud 10 mM naatriumbutanaat (NaBu). Rakke pildistati Cytation™ 5-ga ning kasutades Apereciumit arvutati piltidelt rakutiheduse ja selle kaudu MOI. Nii varieeriti viiruse koguseid ja prooviti muuta ka nakatamis- ja ekspressioonitemperatuuri 30°C juurest raku kasvatus temperatuuri 37°C juurde. Joonisel 6 on näha et madalam temperatuur (pilt A) on siiski sensori ekspresseerimiseks parem. Joonisel 6 on näha rakke, mida ergastati ja pildistati eraldi kollases kanalis (523 nm) ja sinises kanalis (465 nm) ning saadud kahe kanali pildid on üksteise peale asetatud (ingl. k. *overlay*). Kuna 37°C juures inkubeeritud rakkude (pilt B) hulgas on näha mõningaid ainult sinises alas fluoresseeruvaid rakke võib oletada, et sensori tootmises või pakkumises tehti viga ja aktseptorfluorofoorid ei ergastu nii efektiivselt.



Joonis 6 Sama MOIga, kuid erinevatel temperatuuridel nakatatud ja valgu ekspresseeritud CHO-MC4R-K1 rakkud. Pildil (A) rakke hoiti 30°C juures 24 tundi, pildil (B) rakke hoiti 37 °C juures 24 tundi. Pildid on tehtud Cytation™ 5-ga kasutades Olympus UPLFLN 4X objektiivi. Fluorestsents piltide tegemiseks ergastati valgust imiteeriva diodiga (LED) 465 nm sinises alas ja 523 nm kollases alas ning saadud pildid on asetatud üksteise peale (ingl. k. *overlay*).

Joonisel 7 on näha, et mida suurem on MOI, seda rohkem rakke fluorestseerub, seega biosensorit toodetakse enamikes rakkudes. Ka kirjandusest on teada et BacMam viirustega nakatamiseks kasutatakse kõrgeid MOIsid, tavapäraselt MOI 100-400 (Mazina *et al.* 2015). Kasutusel on aga elus rakud, seega liiga suur viiruse kogus ei mõju ka rakkudele hästi. Mikroskoopiga vaadates on täheldatud, et suuremate viiruse koguste juures on näha rakkude morfoloogia muutust (autori tähelepanekud). Rakud tõmbuvad kokku väikesteks ja kerataolisteks või tulevad plaadi küljest lahti ja hõljuvad lahuses. Joonisel 7 on aga näha, et terved rakud on pikliku kujuga ehk antud rakuliinile iseloomuliku morfoloogiaga.



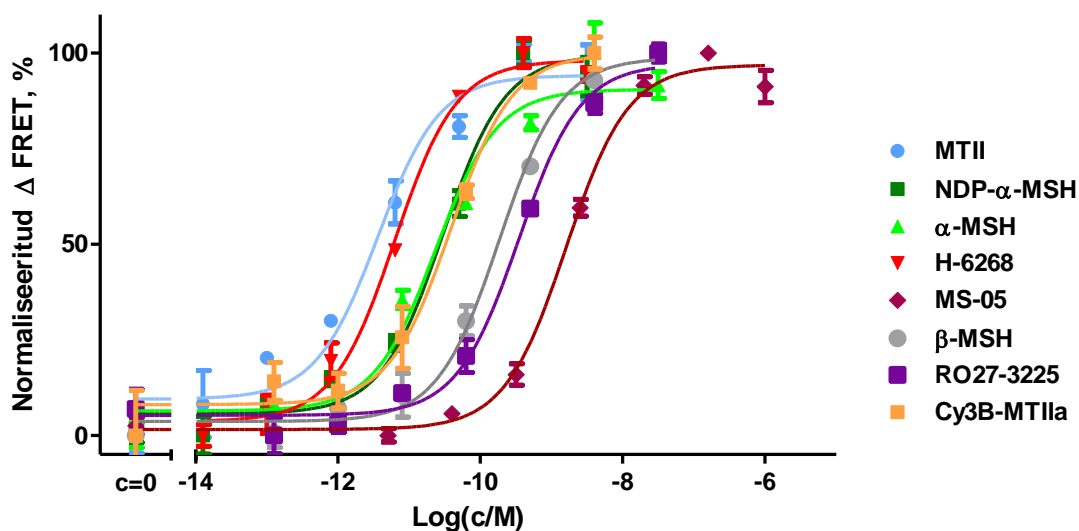
Joonis 7 Erinevatel MOI del nakatatud CHO-MC4R-K1 rakkude fluorestsents pildid. Pildil (A) on nakatamata rakud, pildil (B) on MOI ligikaudu 2, pildil (C) on MOI ligikaudu 20 ja pildil (D) on MOI ligikaudu 200. Pildid on tehtud Cytation™ 5-ga kasutades Olympus UPLFLN 4X objektiivi. Fluorestsents piltide tegemiseks ergastati valgust imiteeriva diodiga (LED) 465 nm sinises alas ja 523 nm kollases alas ning saadud pildid on asetatud üksteise peale (ingl. k. *overlay*).

Parema korratavausega ekspressioonitingimuste saavutamiseks prooviti ka kolmandat nakatamisprotokolli. Rakud võeti Petri tassilt lahti ning lisati viirus ja söötme lahusesse, kuhu lisati 10 mM NaBu. Lahus kanti 100 µl kaupa 96 süvendiga katseplaadile ning rakke inkubeeriti 24 tundi 30 °C juures. Viiruse suspensioon eemaldati alles vahetult enne katse algust ning asendati DPBS-iga. Selline protokoll andis väga häid ja stabiilseid tulemusi, eelvalt saadud kuni 15% Δ FRETi asemel saadi 30%. Uus nakatamisviis suurendab signaaliakent, kuna keskkond ja katsetingimused on rakkudele sobivad, lisaks on protokoll läbiviijale tunduvalt mugavam.

MC4 Retseptori aktivatsiooni uurimine

Käesoleva töö käigus iseloomustati MC4 retseptori aktivatsiooni 8 erineva ligandi poolt, millest 2 on endogeensed agonistid (α -MSH, β -MSH), üks on fluorestsentsmärgisega modifitseeritud MTII derivaat (Cy3b-MTIIa), ja viis on sünteetilised peptiidid (MTII, RO 27-3225, NDP- α -MSH, MS-05, H-6268). Lisaks nähti, et MC4 retseptori tuntud antagonistid SHU-9119 ja HS-024 ei tekitanud bioloogilist vastust.

Antud ligande on eelnevalt iseloomustatud väljatõrjumiskatsedes radioligandiga putukarakkude membraanidel ja fluorestsentsanisotroopia katsetes pungunud bakuloviirusdel (Kopanchuk *et al.* 2005, Veiksina *et al.* 2014). Käesolevas töös teostati funktsionaalkatsed, uurides ligandist tekkivat retseptor-vahendatud bioloogilist vastust elus rakkudes. Nii saadakse teada, kas tegemist on agonisti, antagonistiga või pöördagonistiga ning mis on ligandi aktivatsiooni võimekus (ingl. k *potency*).



Joonis 8 Normaliseeritud bioloogilise vastuse sõltuvus ligandi kontsentratsioonist. Katseks kasutati CHO-K1-MC4R rakuliini, nakatamis protokoll on kirjeldatud eksperimentaalses osas kasutades H188 P3 viirust. Katsed viidi läbi tripikaatides ning iga ligandi jaoks tehti kolm korduskatset, mis viidi läbi erinevatel päevadel. Joonisel on ühe korduskatse tulemused.

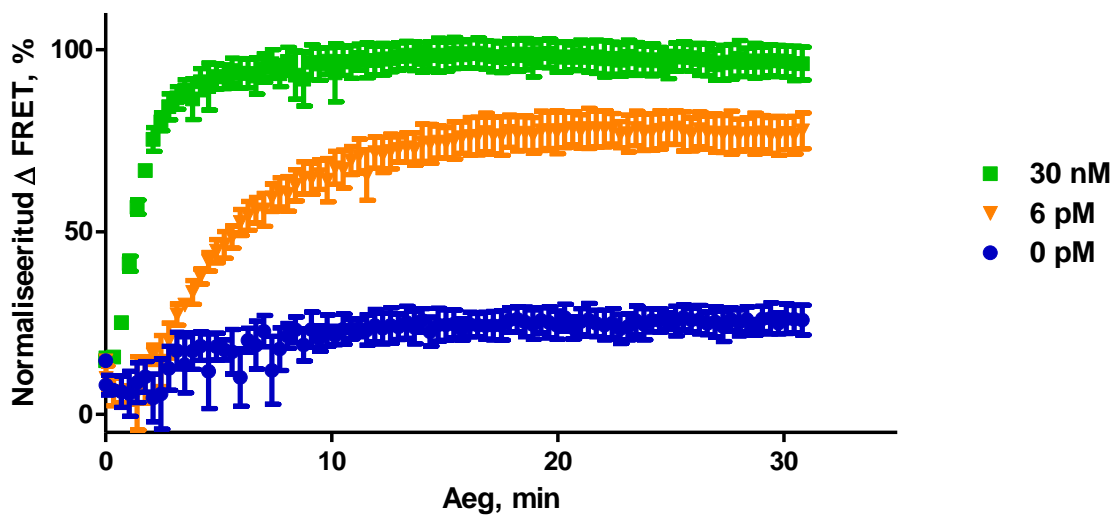
Jooniselt 8 ja tabelist 3 on näha, et kõige kõrgema pEC_{50} väärtusega on MTII, mis on ligikaudu 450 korda parem kui kõige madalama pEC_{50} väärtusega MS-05. Kirjandusest võib leida, et MS-05 on selektiivne Melanokortin-1 (MC1) retseptorile (Szardenings *et al.* 2000), kuid samas on nähtud seostumist nii MC4 retseptorile kui ka teistele melanokortiinsetele retseptoritele (Kopanchuk *et al.* 2005). Tabelist 1 on aga näha, et MS-05 on kõigest 10 korda kehvem kui endogeenne agonist β -MSH. cAMP kontsentratsioon rakus ei pruugi olla lineaarses seoses afiinsusega sidumiskatsetest. Ligandi seostumisel retseptorile ja cAMPi detektsiooni vahele jäävad mitmed olulised reaktsioonid nagu GDP-GTP vahetus ja ATPst cAMPi süntees. Kuna aga kogu süsteemi mehhanism ei ole täpselt teada siis ei saa öelda et ligandi seostumine retseptorile ja cAMPi seostumine Epacile on üks ühele reaktsioon. Seega ligandi võimekuse erinevus afiinsusest võib olla seletatav katsesüsteemi eripärast. Töös on äratoodud ühes kindlas bioloogilises süsteemis määratud pEC_{50} väärtused. Tulemused võivad erineda teistes katseformaatides määratud numbrilistest väärtustest, kuid on väärtuslikud ja olulised nagu ka varem kogutud afiinsuse andmed neile ligandidele.

Erinevatel andmetel on MC4 retseptorile kõige afiinsemaks ligandiks leitud olevat nii α -MSH kui ka vastupidiselt β -MSH (Tao *et al.* 2010, Chaki ja Okuyama 2005). Tabelist 3 ja jooniselt 7 on näha, et antud süsteemi korral α -MSH on võimekam kui β -MSH.

Tabel 4 Ligandide pEC₅₀ väärtused ehk negatiivne logaritmi konsentratsioonist, kus saavutatakse pool maksimaalsest efektist, saadud tulemuste aritmeetilise keskmise standard hälve ja korduskatsete arv.

ligandi nimi	pEC ₅₀	±(SEM)	n
MTII	11,54	0,06	3
H-6268	11,2	0,3	3
α -MSH	10,6	0,2	3
NDP- α -MSH	10,6	0,3	4
Cy3b-MTIIa	10,5	0,2	3
β -MSH	9,8	0,2	3
RO 27-3225	9,4	0,2	3
MS-05	8,9	0,2	3

Joonisel 8 näeb ühe kindla α -MSH, kui tunnusaine, kontsentratsiooniga proovi bioloogilise vastuse teket ajas. On näha, et 10 minutiga on süsteem saavutanud platoo, kuid kindluse mõttes kasutati analüüsiks 30 minuti punkti. Ka süvendis, millel ei lisatud ligandi, tõuseb Δ FRET, aga väga vähesel määral. Näha on, et süsteem on ajas väga stabiilne ning ajas ei toimu sensori pleekumist isegi kui mõõtmised toimusid väikseimate ajavahedega, mida masin võimaldas (21 sekund järel). Kõik teised ained käitusid analoogselt α -MSHle.



Joonis 9 a-MSH kineetika uurimine. Bioloogilise vastuse teke ajas erinevatel ligandi kontsentratsioonidel. Katseks kasutati CHO-K1-MC4R rakuliini, nakatamis protokoll on kirjeldatud eksperimentaalses osas kasutades H188 P3 viirust. Erinevatel kontsentratsioonidel on vastuse suurus ja platoole jõudmise kiirused erinevad.

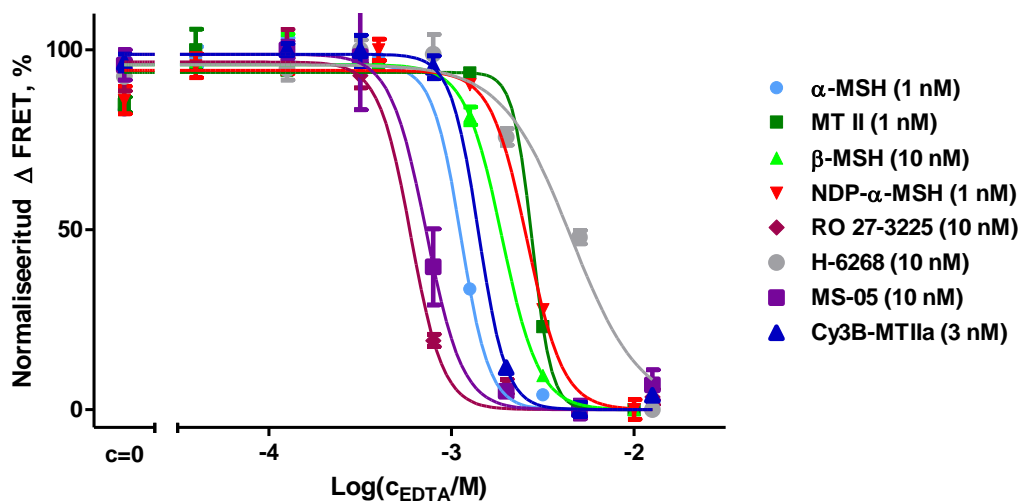
EDTA mõju MC4 retseptori aktivatsioonile

On märgatud, et ligandi sidumisel melanokortiinsetele retseptoritele on olulised kahevalentsed metalliioonid (Kopanchuk *et al.* 2005, Mazina *et al.* 2012). Nad mõjutavad nii assotsiatsiooni- kui ka dissotsiatsioonikineetikat, seega ka afiinsust (Kopanchuk *et al.* 2005, Link 2014). Kahevalentsete kationide mõju uurimiseks tehti katse, kus EDTA sidus lahuses olevaid vabasid ioone ja selgelt on näha, et bioloogiline vastus väheneb EDTA konsentrasiooni suurenedes. Jooniselt 11 on näha, et suuremal osal liganditest on bioloogilise vastuse kadu väga järsk. Konsentrasioonivahemiku valimisel tuli jälgida ka EDTA lahustumist ja seega ei saanud kõigile ligandidele alumist platood kindlalt paika panna.

Tabel 5 Erinevate ligandide EDTA pEC_{50} väärtused antud ligandi kontsentratsioonil, saadud tulemuste aritmeetilise keskmise standardhälve, katses kasutatud ligandi kontsentratsioon ja korduskatsete arv.

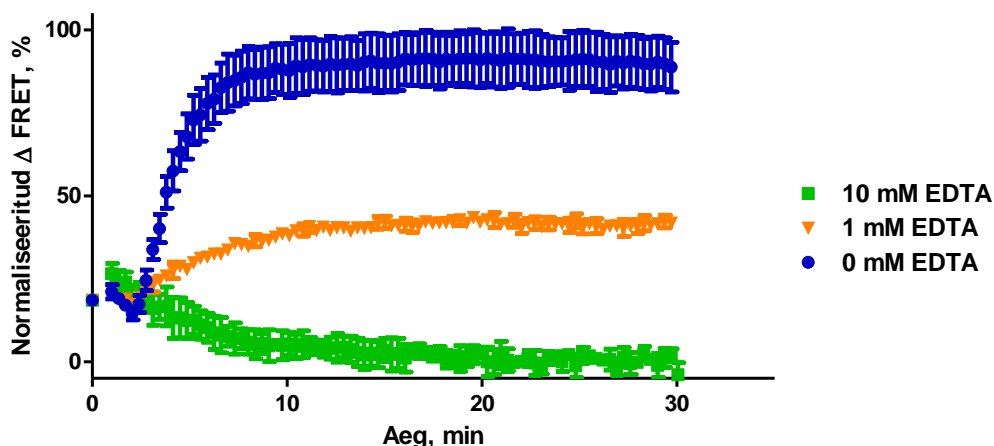
ligandi nimi	pEC_{50}	$\pm(SEM)$	C_{ligand} (nM)	n
RO 27-3225	3,21	0,02	10	3
MS-05	3,1	0,1	10	3
α -MSH	3,1	0,2	1	3
Cy3b-MTIIa	2,9	0,1	3	3
β -MSH	2,8	0,1	10	3
MTII	2,58	0,01	1	3
H-6268	2,39	0,05	10	3
NDP- α -MSH	2,4	0,1	1	3

MTII oli kõige kõrgema pEC_{50} väärtusega ligand ning MTII ei ole ka ionide suhtes tundlik. Selleks et pool bioloogilisest vastusest kaotada on vaja alla 3 mM EDTA lahust. Lähedaste pEC_{50} väärtusega NDP- α -MSH (10,6) ja α -MSH (10,6) on ionide tundlikkuse suhtes väga erinevad. Tabelist 4 võib näha, selleks et kaotada pool maksimaalsest bioloogilisest vastusest on α -MSH korral vaja 5,5 korda rohkem EDTAd kui NDP- α -MSH korral.



Joonis 10 EDTA mõju MC4 retseptori aktivatsioonile. Katseks kasutati CHO-K1-MC4R rakuliini, nakatamis protokoll on kirjeldatud eksperimentaalses osas kasutades H188 P3 viirust. Katsed viidi läbi triplicateides ning iga ligandi jaoks tehti kolm korduskatset, mis viidi läbi erinevatel päevadel.

Analoogselt katsega, kus varieeriti ligandi kontsentratsiooni, saabub ka EDTA mõju uurimise katses platoo 10 minutiga ning süsteem on ajas stabiilne. Jooniselt 11 on näha et 10 mM EDTAga katsepunkti $\Delta FRET$ langeb isegi baastasemest madalamale.



Joonis 11 EDTA mõju 1 nM a-MSH kineetikale. Bioloogilise vastuse tekke ajas erinevatel EDTA kontsentratsioonidel, kuid ühel kindla ligandi kontsentratsiooniga. Katseks kasutati CHO-K1-MC4R rakuliini, nakatamis protokoll on kirjeldatud eksperimentaalses osas kasutades H188 P3 viirust.

Lisaks EDTA mõjule püüti uurida ka erinevate katioonide (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} ja Mn^{2+}) mõju MC4 retseptori aktivatsioonile. $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ sadenemise tõttu ei saa kasutada DPBSi (fosfaat puhver) ning selle asemel prooviti kasutada Krebs-Ringeri puhvrit (0,1 % Pluronic F-127, 11 mM Na-Hepes, 5 mM KCl, 135 mM NaCl). Katsete käigus selgus, et see puhver ei ole aga rakkudele soblik. Rakud tulid katseplaadi küljest lahti ning moodustasid lahuses klompe. Sellepärast saadi ajas väga kõikumavad tulemused ning kindlat kontsentratsioonisõltuvust ei nähtud. Otsustati proovida ka siiski tavapärase DPBS puhvriga, kuid seal nähti ionide seerialahjendusi tehes sadet nii Ca^{2+} , Mg^{2+} kui ka Zn^{2+} ionide korral. Ionide lahustuvust saab suurendada, muutes pH ja temperatuuri, kuna uuritakse elus süsteemi, siis neid parameetreid saab muuta minimaalset.

Käesoleva töö käigus võeti kasutusele uus H188 biosensor ning kohandati see CHO-K1-MC4R rakkude jaoks. H188 biosensori abil uuriti erinevate ligandide mõju MC4 retseptorile ja ka EDTA mõju retseptori aktivatsioonile. Kõik kaheksa uuritud agonisti aktiveerisid MC4 retseptorit, kusjuures maksimaalne vastus saavutati ligikaudu 10 minutiga. Kahevalentsete katioonide vajalikkus MC4 retseptori aktivatsioonile leidis kinnitust.

Kokkuvõte

Käesolevas töös tutvustati GPCRe ja nende ühte tähtsamat, sekundaarse virgatsaine cAMPi signaalirada. Lähemalt räägiti ühest kõige väiksemast GPCRst, milleks on MC4 retseptor ning selle rollist inimkehas. MC4 retseptorit aktiveerivad inimkehas endogeensed peptiidid, mille struktuuridest lähtuvalt on sünteesitud mitmeid uusi agoniste ja antagonistide. Tehti ülevaade Epac valgul põhinevatest FRET biosensorite arengust viimase 12 aasta jooksul ning toodi esile töös kasutatud H188 sensori eelised. Samuti tutvustati biosensori rakku viimiseks kasutatud BacMam süsteemi toimimise mehhanismi.

Eksperimentaalses osas kirjeldati töö käigus õpitud erinevaid tehnikaid. Alustati biosensori kloonimisega, mille käigus viidi korduvalt läbi transfektsiooni, restriksiooni ja ligeerimise etappe. Seejärel liiguti edasi BacMam viiruse tootmiseni putukarakkudes. BacMam viirustele määrati ka uudse ICSE meetodiga tiiter, mida kasutati imetajarakkude nakatamise protsessi optimeerimisel.

Töö tulemusena määrati uudse biosensorsüsteemiga kaheksale ligandile pEC_{50} väärtused. Võrreldes eelnevalt meie laboris kasutuses oleva biosensoriga suurendati signaali akent 2 korda. Vaadeldi bioloogilise vastuse tekkimise kineetikat ning leiti, et kõigi uuritud agonistide korral saavutatakse maksimaalne signaal 10 minuti jooksul. Lisaks sai kinnitust kahevalentsete katioonide vajalikkus MC4 retseptori aktivatsioonile. Töös püstitatud eesmärgid saavutati ning saadud tulemused on plaanis publitseerida osana teadusartiklist.

SUMMARY

In the literature review of the Bachelor's thesis GPCRs and one of their most important signal transduction pathways, cAMP signaling was introduced. A closer look was taken at melanocortin-4 receptor (MC4R), which takes part in many physiological functions in a human body. In humans, MC4R is activated by endogenous peptides, on which basis many new antagonists and agonists have been synthesized. Furthermore, an overview of the development of Epac-FRET biosensors was given. Also, the advantages of the new H188 biosensor, which was used in this work, were discussed. Moreover, basics of the BacMam technology, which was used to express the biosensor in live cells, were explained.

The practical part of the work described all the new techniques that were learned in the courses of this Bachelor's thesis. First of which were associated with DNA cloning - transfection, restriction, and ligation. Next step was making the BacMam viruses in insect cells. For BacMam viruses the concentrations of the infectious particles (viral titers) were determined with the novel ICSE method and it was used in the optimization of mammalian cells infection process.

As the result of this work potency values were determined for 8 ligands with the novel biosensor system. In comparison with the biosensor, which was used in our researchers group before, the dynamic range increased two times. Also, the kinetics of the system were analyzed and it was seen that the maximal response stabilized with 10 minutes. Furthermore, the importance of bivalent ions to biological response was established.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

A Kost, T., Patrick Condreay, J., & S Ames, R. (2010). Baculovirus gene delivery: a flexible assay development tool. *Current gene therapy*, 10(3), 168-173.

Al-Obeidi, F., Hadley, M. E., Pettitt, B. M., & Hruby, V. J. (1989). Design of a new class of superpotent cyclic. alpha.-melanotropins based on quenched dynamic simulations. *Journal of the American Chemical Society*, 111(9), 3413-3416.

Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System ,
http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/bactobac_man.pdf, viimati alla laetud
24.05.2016

Chaki, S., & Okuyama, S. (2005). Involvement of melanocortin-4 receptor in anxiety and depression. *Peptides*, 26(10), 1952-1964.

Chen, C. Y., Lin, C. Y., Chen, G. Y., & Hu, Y. C. (2011). Baculovirus as a gene delivery vector: recent understandings of molecular alterations in transduced cells and latest applications. *Biotechnology advances*, 29(6), 618-631.

Donaldson, J. I. L. L., Hill, S. J., & Brown, A. M. (1988). Kinetic studies on the mechanism by which histamine H1 receptors potentiate cyclic AMP accumulation in guinea pig cerebral cortical slices. *Molecular pharmacology*, 33(6), 626-633.

Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L. G., & Schiöth, H. B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular pharmacology*, 63(6), 1256-1272.

Garland, S. L. (2013). Are GPCRs still a source of new targets?. *Journal of biomolecular screening*, 1087057113498418.

Goedhart, J., van Weeren, L., Hink, M. A., Vischer, N. O., Jalink, K., & Gadella, T. W. (2010). Bright cyan fluorescent protein variants identified by fluorescence lifetime screening. *Nature methods*, 7(2), 137-139.

Heng, B. C., Aubel, D., & Fussenegger, M. (2013). An overview of the diverse roles of G-protein coupled receptors (GPCRs) in the pathophysiology of various human diseases. *Biotechnology advances*, 31(8), 1676-1694.

Hill, S. J., Williams, C., & May, L. T. (2010). Insights into GPCR pharmacology from the measurement of changes in intracellular cyclic AMP; advantages and pitfalls of differing methodologies. *British journal of pharmacology*, 161(6), 1266-1275.

Hruby, V. J., Lu, D., Sharma, S. D., de L. Castrucci, A., Kesterson, R. A., Al-Obeidi, F. A., ... & Cone, R. D. (1995). Cyclic lactam. alpha.-melanotropin analogs of Ac-Nle4-cyclo [Asp5, D-Phe7, Lys10]-. alpha.-melanocyte-stimulating hormone-(4-10)-NH₂ with bulky aromatic amino acids at position 7 show high antagonist potency and selectivity at specific melanocortin receptors. *Journal of medicinal chemistry*, 38(18), 3454-3461.

Klarenbeek, J., Goedhart, J., van Batenburg, A., Groenewald, D., & Jalink, K. (2015). Fourth-generation epac-based FRET sensors for cAMP feature exceptional brightness, photostability and dynamic range: characterization of dedicated sensors for FLIM, for ratiometry and with high affinity. *PloS one*, 10(4), e0122513.

Kopanchuk, S., Veiksina, S., Petrovska, R., Mutule, I., Szardenings, M., Rinken, A., & Wikberg, J. E. (2005). Co-operative regulation of ligand binding to melanocortin receptor subtypes: evidence for interacting binding sites. *European journal of pharmacology*, 512(2), 85-95.

Laasfeld, T. (2016) Bakalausetöö. Automatiseeritud meetodi arendamine bakuloviiruste kvantifitseerimiseks.

Latek, D., Modzelewska, A., Trzaskowski, B., Palczewski, K., & Filipek, S. (2012). G protein-coupled receptors—recent advances. *Acta Biochimica Polonica*, 59(4), 515.

Link, R. (2014) Magistritöö. Ca²⁺ ja Mg²⁺-ioonide mõju iseloomustamine fluorestsentsligandide seostumisprotsessidele Melanokortiin-4 retseptoriga.

Luo, D., & Saltzman, W. M. (2000). Synthetic DNA delivery systems. *Nature biotechnology*, 18(1), 33-37.

- Mazina, O., Reinart-Okugbeni, R., Kopanchuk, S., & Rinken, A. (2012). BacMam system for FRET-based cAMP sensor expression in studies of melanocortin MC1 receptor activation. *Journal of biomolecular screening*, 17(8), 1096-1101.
- Mazina, O., Allikalt, A., Heinloo, A., Reinart-Okugbeni, R., Kopanchuk, S., & Rinken, A. (2015). cAMP assay for GPCR ligand characterization: Application of BacMam expression system. *G Protein-Coupled Receptor Screening Assays: Methods and Protocols*, 65-77.
- Nelson, D., and Cox, M (2004) *Lehninger principles of biochemistry*. Fourth Edition W.H. Freeman and Company, New York
- Nickolls, S. A., Cismowski, M. I., Wang, X., Wolff, M., Conlon, P. J., & Maki, R. A. (2003). Molecular determinants of melanocortin 4 receptor ligand binding and MC4/MC3 receptor selectivity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 304(3), 1217-1227.
- Nikolaev, V. O., Bünemann, M., Hein, L., Hannawacker, A., & Lohse, M. J. (2004). Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *Journal of Biological Chemistry*, 279(36), 37215-37218.
- Ponsioen, B., Zhao, J., Riedl, J., Zwartkruis, F., van der Krogt, G., Zaccolo, M., Moolenaar, W.H., Bos, J.L. & Jalink, K. (2004). Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator. *EMBO reports*, 5(12), 1176-1180.
- Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G., & Kobilka, B. K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 459(7245), 356-363.
- Schiöth, H. B., Muceniece, R. J. E. S., & Wikberg, J. E. S. (1996). Characterisation of the melanocortin 4 receptor by radioligand binding. *Pharmacology & toxicology*, 79(3), 161-165.
- Szardenings, M., Muceniece, R., Mutule, I., Mutulis, F., & Wikberg, J. E. (2000). New highly specific agonistic peptides for human melanocortin MC 1 receptor☆. *Peptides*, 21(2), 239-243.
- Tao, Y. X. (2010). The melanocortin-4 receptor: physiology, pharmacology, and pathophysiology. *Endocrine reviews*, 31(4), 506-543.

van der Krogt, G. N., Ogink, J., Ponsioen, B., & Jalink, K. (2008). A comparison of donor-acceptor pairs for genetically encoded FRET sensors: application to the Epac cAMP sensor as an example. *PloS one*, 3(4), e1916.

Veiksina, S., Kopanchuk, S., & Rinken, A. (2014). Budded baculoviruses as a tool for a homogeneous fluorescence anisotropy-based assay of ligand binding to G protein-coupled receptors: the case of melanocortin 4 receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1838(1), 372-381.

Wallrabe, H., & Periasamy, A. (2005). Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy. *Current opinion in biotechnology*, 16(1), 19-27

INFOLEHT

Melanokortiin-4 retseptori aktivatsiooni uurimine

Uudse biosensori süsteemiga määrati kaheksale ligandile (α -MSH, β -MSH, Cy3b-MTIIa, MTII, RO 27-3225, NDP- α -MSH, MS-05, H-6268) pEC₅₀ väärtused. Võrreldes eelnevalt meie laboris kasutuses oleva biosensoriga suurendati signaali akent 2 korda. Sammuti vaadeldi bioloogilise vastuse tekkimise kineetikat ning leiti, et kõigi uuritud agonistide korral maksimaalne signaal stabiliseerub 10 minutiga. Lisaks sai kinnitust kahevalentsete katioonide vajalikkus MC4 retseptori aktivatsioonile.

Märksõnad: GPCR, Melanokortiin-4 retseptor, Epac-FRET bisensor,

The study of Melanocortin-4 receptor activation

In the course of this work pEC₅₀ values were obtained for 8 ligands (α -MSH, β -MSH, Cy3b-MTIIa, MTII, RO 27-3225, NDP- α -MSH, MS-05, H-6268). In comparison with the biosensor, which was used in our researchers group before, the dynamic range increased two times. Also, the kinetics of the system were analyzed and it was seen that the maximal response stabilized with 10 minutes. Furthermore, the importance of bivalent ions to biological response was established.

Keywords: GPCR, Melanocortin-4 receptor, Epac-FRET biosensor,

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, _____ Maris- Johanna Tahk _____,

(autori nimi)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
_____ MELANOKORTIIN-4 RETSEPTORI AKTIVATSIOONI UURIMINE _____,

(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on _____ Olga Mazina, PhD _____,

(juhendaja nimi)

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.06.2019** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **26.05.2016**